

DOCKET NO.: 211333US0XPCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Cecilia LEAO, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/PT00/00004

INTERNATIONAL FILING DATE: May 31, 2000

FOR: CULTURE MEDIUM FOR THE DETECTION OF ZYGOSACCHAROMYCES

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231


Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

**COUNTRY**  
Portugal**APPLICATION NO**  
102305**DAY/MONTH/YEAR**  
31 May 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/PT00/00004. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)

1. 1000 1000

1. 1000 1000

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

S.  R.  
**PORTUGAL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

REC'D 20 JUN 2000

WIPO

PCT

PT00/00004

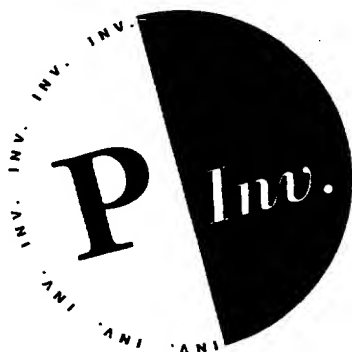
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

**CERTIFICADO DE PEDIDO  
DE PATENTE DE INVENÇÃO**

Certifica-se que os documentos em anexo estão conforme o original do  
pedido de patente de invenção nº. 102305.

O pedido foi apresentado no INPI no dia 31 de Maio de 1999.

Lisboa, 01 de Junho de 2000.



  
Pelo Presidente  
do Instituto Nacional da Propriedade Industrial



**INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

Campo das Cebolas  
1100 LISBOA  
Telef.: (01) 888 51 51/2/3 - Fax: (01) 887 53 08 - 886 00 66  
E-mail : inpi @ mail. telepac. pt

Campo das Cebolas - 1100 LISBOA  
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3  
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01  
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

3 08 - 886 00 66



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

# FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 102305 (11) DATA DO PEDIDO 99/05/31 (22)					
REQUERENTE (71) Universidade do Minho (NOME E MORADA) Largo do Paço  4700-320 BRAGA CÓDIGO POSTAL					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) Cecília Leão Manuela Côrte-Real Dorit Schuller					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)			FIGURA ( para interpretação do resumo)		
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO			
EPIGRAFE (54) Meio de cultura diferencial para a detecção das leveduras <i>Zygosaccharomyces bailii</i> e <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>					

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

A invenção refere-se a um meio de cultura para detectar leveduras pertencentes às espécies *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus* permitindo reduzir drasticamente o tempo e trabalhos envolvidos na identificação convencional destas espécies. A detecção das referidas espécies exige apenas a elaboração de um meio de cultura e a sua inoculação. O meio de cultura, pH 4,50 ± 0,05, apresenta a seguinte composição: sulfato de amónia (0,5%, p/v), dihidrogenofosfato de potássio (0,5%, p/v), sulfato de magnésio heptahidratado (0,05%, p/v), cloreto de cálcio dihidratado (0,013%, p/v), verde de bromocresol (0,005%, p/v), agar (2%, p/v), glucose (0,1%, p/v), ácido fórmico (0,4%, v/v) e vitaminas e oligoelementos em conformidade com a descrição da patente. O verde de bromocresol no meio confere-lhe uma coloração verde que é convertida a azul por aquelas espécies, após 48 horas de incubação.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

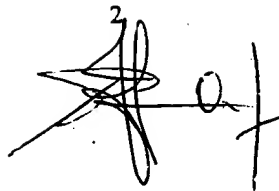


### Descrição:

#### Meio de cultura para a detecção das leveduras *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*

A presente invenção refere-se a um meio de cultura, selectivo ou diferencial, para a detecção, a partir de 48 horas, das leveduras *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*, duas das mais perigosas espécies em termos de deterioração alimentar. Este meio constitui uma alternativa às técnicas convencionais para o despiste rápido destas espécies, permitindo reduzir drasticamente o tempo e trabalho envolvido na identificação convencional destas espécies. Com efeito, normalmente, o estudo da microflora de leveduras presentes nos mais diversos habitats (e.g. alimentos, natureza) envolve uma primeira fase de isolamento das estirpes, através da utilização de meios de cultura selectivos para leveduras em geral, e uma segunda fase de identificação das estirpes isoladas, através da utilização de métodos convencionais e/ou baseados na biologia molecular. Estes métodos clássicos de identificação de leveduras baseiam-se numa série de características de reprodução vegetativa e sexual, e incluem uma vasta gama de testes fisiológicos e bioquímicos. Trata-se de um trabalho muito exigente, que não dá resultados em menos de uma ou duas semanas, e que requer muita experiência para uma correcta interpretação dos resultados. Os métodos de identificação baseados na biologia molecular são, em regra, mais céleres que os clássicos, mas também exigem alguma experiência do operador e envolvem equipamentos e reagentes dispendiosos.

O meio de cultura a que se refere a invenção garante resultados a partir das 48 horas de incubação. Esse meio de cultura é constituído por um meio base mineral, suplementado com vitaminas, oligoelementos e fontes de carbono e de energia. O meio base apresenta a seguinte composição: sulfato de amónia (0,5%, p/v), dihidrogenofosfato de potássio (0,5%, p/v), sulfato de magnésio heptahidratado (0,05%, p/v), cloreto de cálcio dihidratado (0,013%, p/v), verde de bromocresol (0,005%, p/v) e agar (2%, p/v), devendo o pH ser acertado a  $4,50 \pm 0,05$  com um ácido forte. Os compostos do meio base são dissolvidos em 4/5 do volume previsto de água desionizada. A esterilização é realizada em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos. No volume restante de água são dissolvidos os seguintes compostos do meio: glucose (0,1%, p/v), ácido fórmico (0,4%, v/v), solução de oligoelementos A (0,05% v/v), solução de oligoelementos B (0,05% v/v), solução de vitaminas (0,05% v/v) devendo o pH ser acertado a  $4,50 \pm 0,05$  com HCl 1 M. Esta solução é esterilizada por filtração. Esta solução e o meio base são temperadas a

3  


50 ± 5°C antes da sua mistura. O meio completo é homogeneizado e distribuído assepticamente por caixas de Petri. A solução de oligoelementos A tem a seguinte composição: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1%, p/v), KI (0,2%, p/v), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (0,4%, p/v). A solução de oligoelementos B tem a seguinte composição: CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (0,08%, p/v), FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (0,4%, p/v), MnSO<sub>4</sub> · 4 H<sub>2</sub>O (0,8%, p/v), ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (0,8%, p/v) e ácido clorídrico (HCl, 0,012 % v/v). A solução de vitaminas tem a seguinte composição: biotina (0,001%, p/v), pantotenato de cálcio (0,08%, p/v), mio-inositol (4%, p/v), niacina (0,16%, p/v), hidrocloreto de piridoxina (0,16%, p/v) e hidrocloreto de tiamina (0,16%, p/v).

De acordo com a invenção, as células são inoculadas neste meio por espalhamento, estriamento ou aplicação de uma gota de suspensão celular, e incubadas, preferencialmente, a 30°C. O indicador ácido-base (verde de bromocresol) no meio confere-lhe uma coloração verde que é convertida a azul pelas leveduras *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*. Adicionalmente, a mudança rápida de cor das colónias para azul é uma característica específica destas espécies e pode ser visível no meio a partir 48 horas de incubação. A presente invenção pode ser aplicada a estirpes previamente isoladas e purificadas, não havendo qualquer restrição no tipo de inoculação a efectuar. Contudo, o tempo necessário à visualização da viragem do indicador depende da concentração celular do inóculo e da metodologia de inoculação de acordo com a seguir discriminado: i) a aplicação de uma suspensão celular densa (10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> cel/ml) sob a forma de uma gota conduz à viragem do indicador ao fim de 48 horas, ii) a inoculação, por espalhamento, de uma suspensão de células (1 a 3x10<sup>3</sup> cel/ml) permite avaliar o número de colónias a partir de 96 horas. Pode, ainda, ser aplicado a suspensões celulares de populações mistas de leveduras, para além de *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*, dando indicações sobre a presença destas espécies, sempre que se registre uma alteração na cor do meio ou da colónia.

O processo de acordo com a presente invenção será ilustrado, seguidamente, através de exemplos:

#### Exemplo 1

O meio de cultura é constituído por um meio mineral base, suplementado com vitaminas, oligoelementos e fontes de carbono e de energia. O meio base apresenta a seguinte composição: sulfato de amónia (0,5%, p/v), dihidrogenofosfato de potássio (0,5%, p/v), sulfato de magnésio heptahidratado (0,05%, p/v), cloreto de cálcio dihidratado (0,013%, p/v), verde de bromocresol (0,005%, p/v) e agar (2%, p/v),

5º

Meio de cultura diferencial de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, caracterizado por conter todos os componentes à excepção do agar, para detectar leveduras das espécies *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus* em vinhos, ou outros produtos alimentares contendo populações mistas de leveduras.

6º

Meio de cultura diferencial de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um método para a detecção de leveduras das espécies *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*, a integrar em galerias de testes de identificação de leveduras.

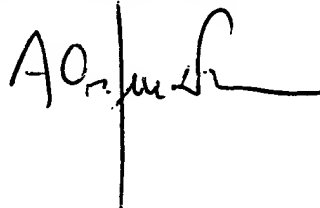
Braga, 13 de Outubro de 1999

Os Requerentes

O Reitor da  
Universidade do Minho



Sociedade de Tratamento de  
Águas e Biotecnologia



## Reivindicações:

1ª

Meio de cultura diferencial caracterizado pelo facto de ser um método para detectar rapidamente leveduras das espécies *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*, constituído por sulfato de amónia (0,5%, p/v), dihidrogenofosfato de potássio (0,5%, p/v), sulfato de magnésio heptahidratado (0,05%, p/v), cloreto de cálcio dihidratado (0,013%, p/v), verde de bromocresol (0,005%, p/v), glucose (0,1%, p/v), ácido fórmico (0,4%, v/v), pH  $4,50 \pm 0,05$ , agar (2%, p/v), vitaminas e oligoelementos.

2ª

Meio de cultura diferencial de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto das leveduras das espécies *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*, quando crescidas neste meio, conduzirem a uma viragem de cor do meio, de verde para azul, a partir de 48 horas, constituindo um método para o despiste rápido de leveduras destas espécies.

3ª

Meio de cultura diferencial de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um método para a detecção de leveduras das espécies *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*, pelo facto destas espécies conduzirem a uma viragem da cor do meio de verde para azul ou à formação de colónias azuis, quando crescidas num meio contendo glucose, ácido fórmico e verde de bromocresol.

4ª

Meio de cultura diferencial de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, caracterizado por ser um método para a detecção de leveduras das espécies *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus* em vinhos, ou outros produtos alimentares contendo populações mistas de leveduras.



descritos no exemplo 1, e permitem concluir que a suspensão contém ou não células das espécies *Zygosaccharomyces bailii* e/ou *Zygosaccharomyces bisporus*, consoante ocorram ou não colónias de coloração azul.

#### Exemplo 4

Como os exemplos 1 e 3, mas utilizando ácido fórmico nas concentrações 0,2 ou 0,3 (% v/v). Todas as estirpes em que as colónias ficam azuis após 96 horas de incubação pertencem às espécies *Zygosaccharomyces bailii* e/ou *Zygosaccharomyces bisporus*. Adicionalmente, no caso de aparecimento no meio de colónias de coloração não azul, permite concluir a presença de leveduras pertencentes a outras espécies.

Nesta situação o meio comporta-se como diferencial.

#### Exemplo 5

Como os exemplos 1 e 3, mas utilizando ácido fórmico na concentração 0,5 (% v/v). Todas as estirpes em que as colónias ficam azuis após 96 horas de incubação pertencem às espécies *Zygosaccharomyces bailii* e/ou *Zygosaccharomyces bisporus*. Nesta situação o meio comporta-se como selectivo não permitindo o crescimento de outras espécies que possam estar presentes na amostra.

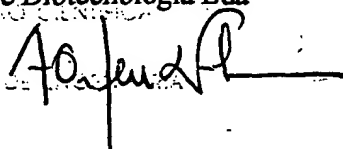
#### Exemplo 6

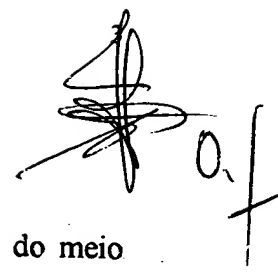
Como o exemplo 1, mas utilizando o meio sem agar distribuído em tubos de ensaio ou em microplacas. Todas as estirpes que conduzirem a uma viragem da cor do meio de verde para azul a partir das 48 horas de incubação pertencem às espécies *Zygosaccharomyces bailii* ou *Zygosaccharomyces bisporus*.

Braga, 25 de Maio de 1999

Os requerentes

  
Universidade do Minho

  
STAB,  
Sociedade de Tratamento de  
Águas e Biotecnologia Lda



devendo o pH ser acertado a  $4,50 \pm 0,05$  com um ácido forte. Os compostos do meio base são dissolvidos em 4/5 do volume previsto de água desionizada. A esterilização é realizada em autoclave, a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos. No volume restante de água são dissolvidos os seguintes compostos do meio: glucose (0,1%, p/v), ácido fórmico (0,4%, v/v), solução de oligoelementos A (0,05% v/v), solução de oligoelementos B (0,05% v/v), solução de vitaminas (0,05% v/v) devendo o pH ser acertado a  $4,50 \pm 0,05$  com um ácido forte. Esta solução é esterilizada por filtração. Esta solução e o meio base são temperadas a  $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$  antes da sua mistura. O meio completo é homogeneizado e distribuído por placas de Petri. A solução de oligoelementos A tem a seguinte composição:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (1%, p/v), KI (0,2%, p/v),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (0,4%, p/v). A solução de oligoelementos B tem a seguinte composição:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (0,08%, p/v),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (0,4%, p/v),  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (0,8%, p/v),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (0,8%, p/v) e ácido clorídrico (HCl, 0,012 % v/v). A solução de vitaminas tem a seguinte composição: biotina (0,001%, p/v), pantotenato de cálcio (0,08%, p/v), mio-inositol (4%, p/v), niacina (0,16%, p/v), hidrocloreto de piridoxina (0,16%, p/v) e hidrocloreto de tiamina (0,16%, p/v). O indicador ácido-base (verde de bromocresol) no meio confere-lhe uma coloração verde que é convertida a azul pelas espécies *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*. Adicionalmente, a mudança de cor das colónias para azul é uma característica específica destas espécies e pode ser visível no meio a partir 48 horas de incubação.

Cada uma das estirpes de levedura a identificar, previamente isolada, é inoculada neste meio, sob a forma de estriamento ou de uma simples risca, e incubada a  $30^{\circ}\text{C}$ . Todas as estirpes em que o meio fica azul a partir de 48 horas de incubação pertencem às espécies *Zygosaccharomyces bailii* ou *Zygosaccharomyces bisporus*.

### Exemplo 2

Como o exemplo 1, mas em que, ao invés de se inocular células de meio sólido se inoculam suspensões de células de uma estirpe. O procedimento para a inoculação é o referido no texto introdutório desta secção e os resultados obtidos são idênticos aos descritos no exemplo 1.

### Exemplo 3

Como o anterior, mas aplicado a suspensões celulares de populações mistas de leveduras, para além de *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus*. Neste caso, para inocular, filtra-se sob vácuo, através de uma membrana filtrante esterelizada (porosidade de  $0,45 \mu\text{m}$ ), uma alíquota da suspensão. Os resultados são similares aos